

**POTENSI EKSTRAK ETANOL TANAMAN PEGAGAN  
(*Centella asiatica*) TERHADAP EKSPRESI  
GLUCOCORTICOID RECEPTOR  $\alpha$  DAN  
GLUCOCORTICOID RECEPTOR  $\beta$   
PADA TESTIS TIKUS (*Rattus  
norvegicus*) USIA TUA**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

**GANANG RILO PAMBUDI**

**145130107111005**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

**Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap  
Ekspresi *Glucocorticoid Receptor  $\alpha$*  dan *Glucocorticoid Receptor  $\beta$*  Pada  
Testis Tikus (*Rattus norvegicus*)  
Usia Tua**

**Oleh :  
GANANG RILO PAMBUDI  
145130107111005**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 19 Juli 2018  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

**Pembimbing I**

**Pembimbing II**

**Dr.Drs.Agung Pramana Warih M.,M.Si**  
NIP. 196506161991111001

**Drh. Fajar Shodiq Permata., M.Biotech**  
NIP. 198705012015041001

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**  
NIP. 19600903 198802 2 001

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ganang Rilo Pambudi

NIM : 145130107111005

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ekspresi *Glucocorticoid Receptor  $\alpha$*  dan *Glucocorticoid Receptor  $\beta$*  Pada Testis Tikus (*Rattus norvegicus*) Usia Tua

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala risiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 31 Juli 2018

Yang menyatakan,

Ganang Rilo Pambudi  
NIM.145130107111005

**Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella Asiatica*) Terhadap Ekspresi *Glucocorticoid Receptor  $\alpha$*  dan *Glucocorticoid Receptor  $\beta$*  pada Testis Tikus (*Rattus norvegicus*) Usia Tua**

**ABSTRAK**

Proses penuaan (*aging*) merupakan proses yang terjadi pada semua makhluk hidup. Pada hewan jantan yang mengalami penuaan terjadi penurunan biosintesis hormon steroid (*steroidogenesis*). *Glucocorticoid* berperan penting dalam *steroidogenesis* dalam mempengaruhi estrogen, sementara *glucocorticoid* bekerja melalui reseptor-reseptornya yang dapat saling mempengaruhi reseptor estrogen melalui aktivator protein 1 (AP1). Penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague Dawley* (SD) berusia 2 tahun dengan berat badan 300 gram yang dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu : kelompok kontrol positif, kelompok yang diberi ekstrak etanol *Centella asiatica* sebanyak 1 mL dengan dosis 100 mg/kg BB, kelompok yang diberi ekstrak etanol *Centella asiatica* sebanyak 1 mL dengan dosis 200 mg/kg BB, dan kelompok yang diberi ekstrak etanol *Centella asiatica* sebanyak 1 mL dengan dosis 300 mg/kg BB selama 21 hari perlakuan. Parameter yang diamati adalah ekspresi *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  dan ekspresi *glucocorticoid receptor  $\beta$*  pada jaringan testis yang diwarnai dengan metode Imunohistokimia (IHK) dan dianalisis secara statistik dengan *one-way ANOVA* ( $\alpha=0,05$ ). Hasil penelitian ini menunjukkan pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) pada dosis 200 mg/KgBB merupakan dosis yang baik untuk meningkatkan ekspresi *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  sebanyak 105% dari kelompok kontrol positif sementara semua perlakuan pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat memberikan efek menurunkan ekspresi *glucocorticoid receptor  $\beta$* .

**Kata kunci** : Penuaan, *glucocorticoid receptor  $\alpha$* , *glucocorticoid receptor  $\beta$* , Estrogen

**Study of Extract Ethanolic Pegagan (*Centella asiatica*) Due to Expression of Glucocorticoid Receptor  $\alpha$  and Glucocorticoid Receptor  $\beta$  of Testis Tissue of Male Aged Rat (*Rattus norvegicus*)**

**ABSTRACT**

Aging is process which occur in all living things. Aging in a male can reduce steroidogenic process. Glucocorticoid action by its receptor can alter estrogen receptor in steroidogenic process by activation of activator protein 1(AP1). In case, measure the expression of glucocorticoid receptor give an information of estrogen activity in steroidogenic process. This research was a laboratory based experiment with the post-test only control group design. Samples were male rat (*Rattus norvegicus*), aged 2 years, and 300 grams of each weight. Samples are grouped into four groups : positive control, first treatment group (100 mg/Kg weight), second treatment group (200 mg/kg weight), and third treatment group (300 mg/kg weight). Ethanolic leaf extract of pegagan (*Centella asiatica*) was given daily to KP 1, KP 2, and KP 3 for 21 days. The expression of glucocorticoid receptor  $\alpha$  and glucocorticoid receptor  $\alpha$  of testis was performed by immunohistochemistry and analyzed using One-Way ANOVA test ( $\alpha = 0.05$ ). The results of this study showed that ethanolic leaf extract of pegagan (*Centella asiatica*) at 200 mg/Kg weight was able to increase the expression of glucocorticoid receptor  $\alpha$  until 105% of positive control group, while all groups which given by ethanolic leaf extract of pegagan (*Centella asiatica*) showed the reduce the expression of glucocorticoid receptor  $\beta$ .

**Key word :** Aging, glucocorticoid receptor  $\alpha$ , glucocorticoid receptor  $\beta$ , Estrogen

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan berkat dan anugrah-Nya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul “Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ekspresi *Glucocorticoid Receptor  $\alpha$*  dan *Glucocorticoid Receptor  $\beta$*  Pada Testis (*Rattus norvegicus*) Usia Tua” ini dapat terselesaikan.

Selama menyusun skripsi, penulis banyak mendapatkan arahan, bimbingan dan bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr.Drs.Agung Pramana Warih M.,M.Si selaku dosen pembimbing I yang telah membantu penulis dalam mengarahkan dan memberi bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan serta dukungan kepada penulis dalam penyusunan dan penyempurnaan skripsi ini.
2. Drh.Fajar Shodiq Permata, M.Biotech selaku dosen pembimbing II yang telah membantu penulis dalam mengarahkan dan memberi bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan serta dukungan kepada penulis dalam penyusunan dan penyempurnaan skripsi ini.
3. drh. Viski Fitri Hendrawan, M.Vet dan Wibi Riawan, S.Si, M.Biomed selaku dosen penguji yang telah memberikan saran, kritik, masukan serta dukungan kepada penulis dalam penyempurnaan skripsi ini.
4. Keluarga penulis, Bapak Hermanto dan Ibu Mamik Mardikaningsih yang selalu memberi kasih sayang, dukungan, dan cinta untuk penulis.
5. Om Momon, Tante Elok, Bu Linda, dan Pak Poh Jun yang sudah menjadi orang tuaku selama di Malang.
6. Teman sejawat dalam pelaksanaan penelitian ini “Risalia, Esti, Aldi, Deden dan Bay” yang bekerjasama dengan baik, serta selalu memberikan dukungan yang tak henti-henti.
7. Bertilla Waidyawimala Gunsatutri yang selalu mendukung dalam pengerjaan skripsi ini.

8. Teman-teman Amaze (2014 A) yang selalu mendukung penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
9. Rekan-rekan KESPER yang selalu memberikan semangat dan keceriaan dalam menyelesaikan skripsi ini.
10. Keluarga Asisten Histologi Veteriner FKH UB yang telah memberikan semangat serta dukungan dalam menyelesaikan skripsi ini.
11. Keluarga Asisten Diagnosa Klinik Veteriner FKH UB yang telah memberikan semangat serta dukungan dalam menyelesaikan skripsi ini.
12. Segenap keluarga “AVENGERS” angkatan 2014 FKH UB atas dukungan serta semangat yang tiada henti.
13. Jajaran petugas administrasi Fakultas Kedokteran Hewan yang telah meluangkan waktunya untuk melayani mahasiswa selama proses ujian skripsi.

Akhir kata, penulis berharap semoga ALLAH S.W.T. membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan hasil dari penelitian ini dapat memberikan manfaat dan menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca.

Malang, 31 Juli 2018

Penulis



## DAFTAR ISI

Halaman

<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>LEMBAR PERNYATAAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>v</b>
<b>KATA PENGANTAR .....</b>	<b>vi</b>
<b>DAFTAR ISI .....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN .....</b>	<b>xiii</b>
<b>BAB 1 PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Batasan Masalah .....	3
1.4 Tujuan Penelitian .....	4
1.5 Manfaat Penelitian .....	5
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>6</b>
2.1 Penuaan .....	6
2.1.1 Patofisiologi Penuaan .....	7
2.1.2 Teori Penuaan .....	8
2.2 Tanaman Pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ) .....	9
2.2.1 Kandungan Nutrisi Tanaman Pegagan .....	10
2.3 Hewan Coba Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) .....	11
2.3.1 Karakteristik Testis Tikus Tua .....	13
2.4 Aromatisasi Androgen .....	14
2.5 Reseptor Glucocorticoid .....	16
2.5.1 <i>Glucocorticoid Receptor <math>\alpha</math></i> .....	16
2.5.2 <i>Glucocorticoid Receptor <math>\beta</math></i> .....	17
2.6 Proses Pembentukan Spermatozoa .....	18
2.7 Anatomi dan Fisiologi Testis .....	19
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN .....</b>	<b>21</b>
3.1 Kerangka Konseptual .....	21
3.2 Hipotesis Penelitian .....	25
<b>BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>26</b>
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	26
4.2 Sampel Penelitian .....	26
4.3 Rancangan Penelitian .....	27
4.4 Variabel Penelitian .....	27



4.5 Materi Penelitian .....	28
4.5.1 Alat Penelitian.....	28
4.5.2 Bahan Penelitian .....	28
4.6 Tahapan Penelitian .....	28
4.6.1 Preparasi Hewan Coba .....	28
4.6.2 Pembuatan Ekstrak Etanol .....	29
4.6.3 Pemberian Ekstrak Etanol.....	29
4.6.4 Pengambilan Sampel Organ Testis .....	30
4.6.5 Analisa Reseptor GR $\alpha$ dan GR $\beta$ .....	30
4.7 Analisa Data .....	31
<b>BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>33</b>
5.1 Pengaruh Ekstrak Pegagan Terhadap GR $\alpha$ .....	33
5.2 Pengaruh Ekstrak Pegagan Terhadap GR $\beta$ .....	38
<b>BAB VI PENUTUP .....</b>	<b>44</b>
6.1 Kesimpulan .....	44
6.2 Saran .....	44
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>45</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>49</b>



## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1. Kandungan Nutrisi Pegagan.....	11
2.2. Data Biologis Tikus .....	12
4.1. Kelompok Perlakuan Penelitian.....	27
5.1. Hasil Imunohistokimia <i>Glucocorticoid Receptor <math>\alpha</math></i> .....	35
5.2. Hasil Imunohistokimia <i>Glucocorticoid Receptor <math>\beta</math></i> .....	40



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Tanaman Pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ) .....	10
2.2 Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Galur Sprague Dawley .....	12
2.3 Vaskularisasi Testis Tikus Usia 40 Hari .....	14
2.4 Struktur <i>Glucocorticoid Receptor <math>\alpha</math></i> .....	17
2.5 Struktur <i>Glucocorticoid Receptor <math>\beta</math></i> .....	18
2.6 Proses Spermatogenesis.....	19
2.7 Struktur Histologi Testis.....	20
3.1 Skema Kerangka Konseptual .....	21
5.1 Hasil Imunohistokimia <i>Glucocorticoid Receptor <math>\alpha</math></i> .....	34
5.2 Hasil Imunohistokimia <i>Glucocorticoid Receptor <math>\beta</math></i> .....	38



**DAFTAR LAMPIRAN**

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
1. Skema Penelitian .....	50
2. Pembuatan Ekstrak Etanol Pegagan .....	51
3. Perhitungan Dosis Terapi Pegagan .....	52
4. Metode Immunohistokimia.....	54
5. Uji Anova.....	55
6. Laik Etik Penelitian .....	57
7. Determinasi Pegagan .....	58



## DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
GR $\alpha$	<i>Glucocorticoid receptor <math>\alpha</math></i>
GR $\beta$	<i>Glucocorticoid receptor <math>\beta</math></i>
SD	Sprague Dawley
PBS	Phosphat Buffer Saline
NaCL	Natrium Chlorida
HE	Hematoxylin Eosin
DNA	Deoxyribonucleic Acid
FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i>
LH	Luteinizing Hormone
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
ER	<i>Estrogen Receptor</i>
AP1	Activator Protein 1
DHEA	Dehydroepiandrosterone

## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Dewasa ini usaha pembibitan ternak sangat digemari di kalangan peternak. Hal ini didukung dengan permintaan masyarakat terhadap peningkatan mutu dari bibit hewan ternak. Beberapa permasalahan yang sering ditemui dalam usaha pembibitan ternak adalah turunnya kualitas genetik bibit ternak akibat penuaan. Peningkatan usia ternak dapat berpengaruh terhadap kualitas spermatozoa yang dihasilkan, hal ini disebabkan karena adanya proses degenerasi pada sel-sel tubuh akibat proses penuaan termasuk pada organ reproduksi (Riyadhi *et al.*, 2012).

Penuaan atau *aging* merupakan proses yang selalu dialami makhluk hidup. Penuaan pada ternak sangat berpengaruh terhadap kualitas spermatozoa yang dihasilkan, sehingga dapat merugikan bagi pemilik usaha pembibitan ternak. Penuaan dapat menimbulkan kerugian yang besar pada peternak diantaranya adalah menurunnya performa, efisiensi dan produktivitas kerja hewan. Hubungan antara penuaan dan perubahan hormon terjadi timbal balik, yaitu proses penuaan mempengaruhi produksi hormon begitu pula sebaliknya penurunan hormon yang menyebabkan timbulnya keluhan-keluhan penuaan (Pangkahila, 2007).

Proses penuaan terkait hormonal diakibatkan adanya kondisi kekurangan zat *dehydroepiandrosterone* (DHEA) yang merupakan *steroid endogeneous* yang dihasilkan oleh hormon adrenal pada makhluk hidup sebagai prekursor dari hormon androgen dan estrogen yang dihasilkan oleh adrenal (Arlt, 2004). Penurunan dari *dehydroepiandrosterone* (DHEA) erat dikaitkan dengan kondisi

penuaan makhluk hidup, sehingga perlu adanya penambahan *dehydroepiandrosterone* (DHEA) secara eksogen melalui imbuhan pakan untuk meningkatkan performa reproduksi dari makhluk hidup yang mengalami penuaan.

*Dehydroepiandrosterone* (DHEA) memiliki peran penting dalam sistem reproduksi makhluk hidup. Salah satu fungsi hormonal yang diperankan *dehydroepiandrosterone* (DHEA) adalah mempengaruhi golongan senyawa glucocorticoid (Pinto *et al.*, 2014). Peningkatan terhadap *dehydroepiandrosterone* (DHEA) secara eksogen penting diberikan untuk menjaga fungsi reproduksi hewan terutama menjaga level senyawa golongan glucocorticoid agar tetap stabil di dalam tubuh untuk menjaga proses steroidogenesis dalam menghasilkan estrogen dengan jalan mengaktivasi ekspresi *estrogen receptor* (ER) melalui aktivitas *activator protein 1* (AP1). Senyawa glucocorticoid dalam tubuh bekerja melalui dua macam reseptor dari glucocorticoid yaitu *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  (GR $\alpha$ ) dan *glucocorticoid receptor  $\beta$*  (GR $\beta$ ). *Glucocorticoid receptor  $\alpha$*  (GR $\alpha$ ) bekerja dengan menunjukkan aktivitas ikatan terhadap ligan pada gen target, sementara *glucocorticoid receptor  $\beta$*  (GR $\beta$ ) tidak menunjukkan aktivitas ikatan terhadap ligan atau transaktivasi pada gen target (Amanda dan Cidlowski, 2013).

Fitosterol merupakan bahan kolesterol yang banyak terdapat pada tumbuhan yang berperan penting dalam tubuh untuk proses steroidogenesis. Salah satu tumbuhan yang banyak terdapat kandungan fitosterol adalah tanaman pegagan (*Centella asiatica*). Tanaman pegagan (*Centella asiatica*) merupakan tanaman yang banyak tumbuh pada dataran rendah. Fitosterol pada tanaman pegagan mempunyai sifat estrogenik yang dapat meningkatkan produksi hormon estrogen melalui jalur



aktivasi *activator protein 1* (AP1) terhadap reseptor estrogen melalui reseptor glucocorticoid ataupun reaksi langsung terhadap reseptor estrogen melalui *estrogen response element* (ERE).

Penelitian ini merupakan penelitian secara eksperimental yang dilakukan untuk mengukur efek ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) aktivitas glucocorticoid melalui reseptornya terhadap proses hormonal steroidogenesis pada hewan jantan yang mengalami penuaan melalui metode immunohistokimia.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. Apakah pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat mempengaruhi ekspresi *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua?
2. Apakah pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat mempengaruhi ekspresi *glucocorticoid receptor  $\beta$*  pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua?

## 1.3 Batasan Masalah

1. Hewan coba yang digunakan yaitu tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) sejumlah 20 ekor dengan usia 1-2 tahun dengan berat badan 300 gram yang telah mendapatkan sertifikasi laik etik dari Universitas Brawijaya nomor 842-KEP-UB (**Lampiran 6**).

2. Dosis pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebanyak 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, 300 mg/kgBB yang diberikan secara per oral selama 21 hari.
3. Volume pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) yang diberikan sebanyak 1 mL selama 21 hari yang diberikan secara per oral sesuai dengan kelompok perlakuan. Simplisia tanaman pegagan (*Centella asiatica*) telah mendapat determinasi tumbuhan dari UPT Materia Medica Batu No. 074/373/102.7/2017 (**Lampiran 8**).
4. Variabel yang diamati yaitu ekspresi *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  dan *glucocorticoid receptor  $\beta$*  yang dianalisa dengan metode immunohistokimia. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya dengan 20 lapang pandang dengan perbesaran 1000x.
5. Analisa terhadap ekspresi *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  dan ekspresi *glucocorticoid receptor  $\beta$*  dilakukan secara kuantitatif menggunakan *one way Analysis of Variance* (ANOVA) dengan *software IBM SPSS Statistic 16.0*.

#### 1.4 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan yang diharapkan penulis untuk penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat mempengaruhi ekspresi *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua.

2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat mempengaruhi ekspresi *glucocorticoid receptor*  $\beta$  pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua.

### 1.5 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang diharapkan penulis untuk penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Penelitian ini dapat digunakan sebagai kajian ilmiah pemanfaatan tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebagai kandidat agen profertilitas alami untuk meningkatkan aktivitas spermatogenesis pada usia penuaan.
2. Penelitian ini dapat digunakan sebagai literatur pemanfaatan tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebagai agen profertilitas alami dalam dunia kedokteran hewan.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Penuaan

Semua makhluk hidup akan mengalami proses penuaan atau *aging* yang diikuti dengan bertambahnya usia. Semakin bertambahnya usia, maka terjadi penurunan berbagai fungsi organ tubuh dari tingkat seluler, organ, hingga sistem karena proses penuaan, hal ini terjadi seiring dengan berjalannya waktu. Penuaan atau *aging* merupakan suatu proses menghilangnya kemampuan jaringan secara perlahan untuk memperbaiki dan mempertahankan struktur serta fungsi normalnya (Cunningham, 2003). Proses penuaan dapat terjadi pada seluruh organ tubuh baik organ dalam tubuh diantaranya jantung, paru-paru, indung telur, testis, otak dan organ terluas yaitu kulit.

Penuaan atau *aging* dapat terjadi pada hewan jantan maupun betina, yang mempengaruhi fisiologi tubuh hewan tersebut. Penuaan pada hewan jantan tidak memberikan efek berkurangnya ukuran dan berat testis tetapi menyebabkan sel Leydig akan berkurang. Penurunan aktivitas dan jumlah sel Leydig menyebabkan produksi sperma dan testosteron mengalami penurunan sehingga menyebabkan penurunan libido dan kegiatan seksual pada pejantan usia tua (Soejono, 2004).

Terdapat 2 macam usia yang dikenal dalam penuaan atau *aging* yaitu usia kronologis dan usia fisiologis. Pada usia kronologis merupakan usia sebenarnya berdasarkan tahun kelahiran individu, sementara usia fisiologis merupakan usia yang memperhatikan fisik dengan melihat pengurangan efisiensi dari sistem organ seperti jantung, paru-paru dan sistem sirkulasi (Soenarjo, 2012).

### 1.1.1 Patofisiologi Penuaan

Menurut Pangkahila (2007) proses penuaan terbagi menjadi tiga tahapan yaitu tahap subklinik, tahap transisi, dan tahap klinik.

#### 1. Tahap Subklinik

Pada tahap subklinik terjadi penurunan aktivitas hormonal dari tubuh. Beberapa hormon yang mengalami penurunan yaitu hormon gonadotropin seperti testosteron, estrogen, dan hormon pertumbuhan yaitu *growth hormon*. Pada tahapan ini tidak kerusakan tidak tampak dari luar sehingga pada usia ini masih dianggap sebagai usia muda dan normal.

#### 2. Tahap Transisi

Pada tahap transisi penurunan aktivitas hormonal terjadi hingga 25% yang ditandai juga dengan penurunan massa otot sebanyak satu kilogram setiap tahunnya. Pada tahap transisi organisme sudah terlihat tidak muda dan tampak tua.

#### 3. Tahap Klinik

Pada tahap klinik penurunan aktivitas hormonal semakin terlihat yang meliputi penurunan aktivitas testosteron, estrogen, hormon tiroid dan melatonin. Penurunan aktivitas hormonal menyebabkan kemunduran sistem organ yang lebih nyata.

### 1.1.2 Teori Penuaan

Terdapat beberapa teori penuaan yang terdiri dari 4 dasar teori diantaranya (Goldman dan Klatz, 2007) :

1. Teori Neuroendokrin

Teori ini menjelaskan bahwa penuaan menyebabkan penurunan aktivitas hormonal pada organ tubuh yang menyebabkan terganggunya sistem organ tubuh.

2. Teori Kontrol Genetik

Teori ini berdasarkan pada genetik yang menyandi bahan genetik DNA. Setiap organisme memiliki kode genetik yang unik yang menyebabkan perbedaan fungsi fisik dan mental diantara individu lain sehingga penurunan genetik menentukan umur dan kecepatan proses penuaan pada tiap organisme.

3. Teori "*Wear and Tear*"

Teori ini menjelaskan bahwa penuaan dapat terjadi akibat kerusakan sel yang disebabkan sel mengalami kerusakan. Kerusakan ini terjadi dimulai dari tingkat sel hingga tingkat organ.

4. Teori Radikal Bebas

Pada teori ini dijelaskan bahwa penuaan terjadi akibat akumulasi bahan radikal bebas dalam sel yang terjadi sepanjang waktu. Radikal bebas merupakan molekul yang mempunyai sekelompok atom dengan elektron yang tidak berpasangan

apabila radikal bebas tidak diinaktivasi, reaktivitasnya dapat merusak seluruh tipe makromolekul seluler, termasuk karbohidrat, protein, lipid dan asam nukleat. Radikal bebas dapat menyebabkan kerusakan sel dengan cara menarik molekul yang tersebut sehingga menyebabkan kerusakan sel, gangguan fungsi sel, hingga kematian sel. Molekul utama dalam tubuh yang dirusak oleh radikal bebas adalah DNA, lemak dan protein. Seiring dengan bertambahnya usia akan menyebabkan akumulasi kerusakan sel akibat radikal bebas, sehingga mengganggu metabolisme sel.

## 1.2 Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*)

Tanaman pegagan termasuk tanaman liar yang banyak tumbuh di jalan, daerah persawahan, perkebunan, dan tanah agak lembap ataupun agak ternaungi. Vegetasi tanaman pegagan (*Centella asiatica*) banyak ditemukan di daerah dataran rendah sampai dengan dataran tinggi (2500 m dpl) (Dalimartha, 2000).

Tanaman pegagan (*Centella asiatica*) (**Gambar 2.1**) merupakan tanaman yang tidak berbatang, mempunyai rimpang pendek, panjang sekitar 10-80 cm, banyak percabangan yang membentuk tumbuhan baru, berdaun tunggal, bertangkai panjang dan tersusun 2 hingga 10 helai daun. Daun pegagan berwarna hijau dan berbentuk seperti kipas. Tangkai daun pegagan berbentuk seperti pelepah dengan panjang 5 cm hingga 15 cm. Bunga pada tanaman pegagan berwarna putih atau merah muda yang tersusun dalam karangan berbentuk payung. Buah pegagan berbentuk lonjong atau pipih dengan ukuran 2 mm sampai



2,5 mm. Buah pegagan berdinding agak tebal, kulitnya keras, berlekuk dua dan berwarna kuning (Winarto dan Surbakti, 2003).

Tanaman pegagan (*Centella asiatica*) secara klasifikasi dapat diuraikan sebagai berikut:

Kingdom : Plantae

Divisi : Spermatophyta

Sub-divisi : Angiospermae

Kelas : Dikotyledonae

Ordo : Umbellales

Famili : Umbelliferae

Genus : *Centella*

Spesies : *Centella asiatica*



**Gambar 2.1** Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*)

#### **1.2.1 Kandungan Nutrisi Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*)**

Tanaman pegagan mengandung banyak zat kimia yang bermanfaat.

Tanaman pegagan mengandung berbagai bahan aktif seperti triterpenoid saponin, flavonoid, fitosterol dan komponen lain seperti alkaloid, steroid, carotenoid, tannin, klorofil, garam inorganik, polisakarida, asam amino,

dan asam lemak (Sutardi, 2016). Berikut merupakan kandungan kimia tanaman pegagan:

**Tabel 2.1** Kandungan Nutrisi Tanaman Pegagan (Kormin, 2015)

Tanaman Pegagan ( <i>Centella asiatica</i> )	% E.P	Komposisi Nutrisi tiap 100g sampel					
		Komposisi Proksimat					
		Kcl Energi	g Air	g Protein	g Lemak	g CHO	g Serat Abu
		37	87,7	2	0,2	6,7	1,6 1,8
		Vitamin					
		µg Retinol	µg Karoten	µg RE	µg B1	µg B2	µg Niacin C
		0	2649	442	0,09	0,19	0,1 48,5
		Mineral					
		mg Ca	mg P	mg Fe	mg Na	mg K	- -
		171	32	5,6	21	391	

Tanaman pegagan memiliki sifat profertilitas dikarenakan memiliki kandungan fitosterol. Kandungan bahan aktif fitosterol sangat penting sebagai bahan pembentuk hormon seksual. Senyawa fitosterol dapat mempengaruhi sel leydig dalam menghasilkan hormon testosteron yang berfungsi untuk pematangan akhir spermatozoa, mengatur sifat-sifat seks sekunder, dan rangsangan seksual (Sutardi, 2016).

### 2.3 Hewan Coba Tikus

Hewan coba merupakan hewan yang digunakan dalam suatu model percobaan. Tikus putih baik digunakan sebagai hewan model percobaan karena mudah dipelihara, mudah berkembangbiak sehingga cepat mendapatkan hewan coba yang seragam (Berata *et al.*, 2010). Tikus putih (**Gambar 2.2**) memiliki

ciri-ciri berambut putih, bermata merah, panjang ekor 205 mm, panjang tubuh 440 mm, serta mencapai berat dewasa sekitar 100-105 gram (Akbar, 2010).



**Gambar 2.2** Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Tikus galur *Sprague Dawley* merupakan tikus dengan ciri-ciri berwarna putih, berkepala kecil, dan ekornya lebih panjang dari badannya. Tikus *Sprague Dawley* merupakan jenis *outbreed* dari tikus putih albino dengan keunggulan ketenangan dan kemudahan dalam penangannya (Maula, 2014). Tikus putih memiliki rata-rata usia mencapai 2 hingga 3 tahun dengan usia dewasa 40-60 hari. Berat tikus putih galur *sprague dawley* adalah 300-400 gram untuk pejantan dan 250-300 gram untuk betina, secara fisiologis tikus putih galur *sprague dawley* memiliki suhu rektal mencapai 36-39°C, frekuensi pernafasan 65-115/menit, tekanan darah mencapai 90-180 mmHg, dan denyut jantung mencapai 330-480/menit (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988). Data biologis untuk tikus putih *Sprague Dawley* adalah sebagai berikut:

**Tabel 2.2** Data Biologis Tikus Putih *Sprague Dawley* (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988).

Lama Hidup (Life Span)	2-3 tahun, dapat mencapai 4 tahun
Umur Dewasa	40-60 hari

Berat Dewasa	300-400 g untuk jantan 250-300 g untuk betina
Suhu (Rektal)	36-39°C (rata-rata 37,5°C)
Pernafasan	65-115/menit
Denyut Jantung	330-480/menit
Tekanan Darah	90-180 mmHg

Secara taksonomi, tikus putih *Sprague Dawley* menurut Myers dan Armitage (2004) :

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

Kelas : Mammalia

Ordo : Rodentia

Subordo : Myomorpha

Famili : Muridae

Genus : *Rattus*

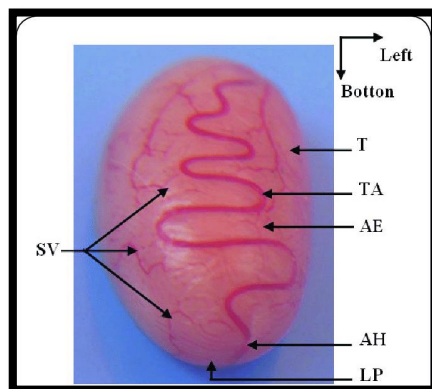
Spesies : *Rattus norvegicus*

### 2.3.1 Karakteristik Testis Tikus Tua

Tikus mencapai usia pubertas pada usia rata-rata 50 hari setelah kelahiran. Hal ini menunjukkan pada pada 1 tahun usia manusia sama dengan 3,3 hari usia tikus (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988). Perkembangan testis tikus semakin bertambah seiring dengan bertambahnya usia tikus, pada tikus muda

testis akan bertambah ukuran dan mencapai puncaknya pada usia 40 hingga 60 hari sebagai usia dewasa tikus putih. Pada usia dewasa tikus, terjadi perubahan pada susunan testis diantaranya bertambahnya berat dan volume testis (Okon *et al.*, 2017)

Secara histologis, testis tikus akan bertambah jumlah sel, volume, sitoplasma, dan volume dari sel leydig. Pada usia 28 hari setelah kelahiran jumlah sel progenitor testis akan bertambah pada tikus dan mencapai puncak pada usia 56 hari yang ditandai dengan banyaknya sel spermatogonium yang dihasilkan, sementara secara anatomi makros testis tikus putih usia 60 hari akan menunjukkan tingginya vaskularisasi pada testis (Okon *et al.*, 2017) (**Gambar 2.3**). Penentuan umur reproduksi pada tikus yaitu dengan mempelajari fase hidup tikus diantara rentang usia 21 hari masa sapih, fase kematangan seksual atau pubertas mulai 40-60 hari, fase pradewasa saat usia 63-70 hari, dan fase penuaan pada usia 15-24 bulan (Sengupta, 2013). Seiring bertambahnya usia terjadi peningkatan lebar, panjang, dan berat testis serta vaskularisasi yang akan mencapai puncaknya pada fase dewasa (Sengupta, 2013).



**Gambar 2.3** Vaskularisasi Testis Usia 40 Hari (Okon *et al.*, 2017).

#### 2.4 Aromatisasi Androgen

Sistem endokrin tubuh menghasilkan tiga kelompok hormon diantaranya polipeptida, amin, dan steroid. Steroidogenesis merupakan jalur biosintesis yang memproduksi hormon steroid. Hormon steroid terdiri dari lima kelas yaitu testosteron (androgen), progesteron (progestin), aldosteron (mineralokortikoid), dan estradiol (estrogen). Estrogen, testosteron, dan progestin dikelompokkan dalam kelompok hormon steroid seks. Enzim aromatase atau estrogen synthase termasuk dalam bagian dari keluarga besar sitokrom P450. Enzim aromatase P450 dikode oleh gen CYP19 dan berperan dalam proses perubahan androgen menjadi estradiol (Wang *et al.*, 2001).

Androgen adalah hormon steroid yang berperan dalam menentukan ekspresi fenotip jantan, seperti perkembangan ciri seks sekunder, menjaga proses spermatogenesis dan berperan dalam organisasi, perkembangan, fungsi reproduksi serta proses-proses biologik. Androgen disekresikan ke dalam aliran darah dan sebagian besarnya membentuk testosteron, produksi androgen didalam tubuh terjadi didalam sel leydig dan diregulasi oleh aksis hipotalamus-pituitari-gonad.



Sekresi androgen dimulai dari Hipotalamus yang mensekresikan pulsus *gonadotropin releasing hormon* (GnRH) setiap 90-120 menit dan berikatan dengan gonadotrop di dalam pituitari anterior sehingga merangsang sekresi *luteinizing hormone* (LH) dan *follicle stimulating hormone* (FSH) yang kemudian menstimulasi sel-sel leydig untuk menghasilkan androgen, lalu umpan balik pada pituitari untuk menghambat sekresi GnRH dan LH. Proses perubahan hormon androgen menjadi estradiol di dalam tubuh melibatkan adanya enzim yaitu enzim aromatase. Estradiol merupakan hormon yang penting dalam saluran kelamin jantan, estradiol pada jantan dihasilkan melalui proses aromatisasi. Aromatisasi terjadi dengan bahan androgen yang diubah menjadi estradiol melalui reaksi enzimatis. Estradiol memiliki peran penting pada sistem reproduksi jantan diantaranya adalah untuk pengaturan ereksi pada penis, pengaturan libido, menjaga ukuran testis dan proses spermatogenesis (Schluster *et al.*, 2016).

## 2.5 Reseptor Glucocorticoid

Glucocorticoid memiliki banyak peran dalam berbagai proses perkembangan yang terjadi di dalam jaringan hewan. Pada proses fisiologis, glucocorticoid berperan penting dalam respon antiinflamasi, metabolisme dan reproduksi. Glucocorticoid diaktifkan melalui reseptor glucocorticoid yang berikatan dengan ligan. Reseptor glucocorticoid pada testis dapat ditemukan di daerah basal dan interstitial dari testis (Kheirabad *et al.*, 2016). Reseptor glucocorticoid dapat ditemukan di sel sertoli, pada sel sertoli glucocorticoid berperan dalam sirkulasi level gonadotropin, maturasi *germ cel*, dan pengaturan spermatogenesis (Hazra *et al.*, 2013). Reseptor glucocorticoid merupakan bagian



dari *superfamily receptor* hormon steroid yang bekerja secara spesifik dengan berikatan antara ligan dan reseptor pada promotor gen yang kemudian dapat mengaktifkan atau menghambat proses transkripsi sebagai akibat dari ikatan tersebut (Kinyamu dan Archer, 2003). Glucocorticoid bekerja melalui reseptor yang terdiri atas *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  dan *glucocorticoid receptor  $\beta$* , kedua reseptor tersebut bekerja berlawanan dengan peran dan fungsi masing-masing sebagai berikut:

### 1.5.1 *Glucocorticoid Receptor $\alpha$*

*Glucocorticoid receptor  $\alpha$*  tersusun atas protein dengan berat molekul sebesar 97 Kd, reseptor ini bekerja dengan cara ikatan spesifik terhadap glucocorticoid, berinteraksi dengan *heat shock protein* (HSP), dan transaktivasi. Aktivitas *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  adalah dengan ikatan ligan sehingga terjadi ikatan antara *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  dengan ligan (Harman *et al.*, 2004). Struktur *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  (GR $\alpha$ ) memiliki struktur yang tersusun atas daerah amino terminal domain (NTD), *DNA binding domain*, dan *Ligand Binding Domain* sepanjang 777 (**Gambar 2.4**) (Amanda dan Cidlowski, 2013).



**Gambar 2.4** Struktur *Glucocorticoid Receptor  $\alpha$*   
(Amanda dan Cidlowski, 2013).

### 1.5.2 Glucocorticoid Receptor $\beta$

*Glucocorticoid Receptor  $\beta$*  memiliki aktivitas yang berbeda dengan *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  yaitu tidak berikatan dengan ligan sehingga *glucocorticoid receptor  $\beta$*  tidak memiliki aktivitas untuk mengikat molekul glucocorticoid. *Glucocorticoid receptor  $\beta$*  dapat bekerja dengan menghambat reseptor glucocorticoid  $\alpha$ , sehingga memiliki kerja yang bersifat antagonis (Harman *et al.*, 2004). Struktur reseptor glucocorticoid  $\beta$  memiliki struktur yang tersusun atas daerah amino terminal domain (NTD), *DNA binding domain*, dan *Ligand Binding Domain* sepanjang 742 (**Gambar 2.5**) (Amanda dan Cidlowski, 2013).



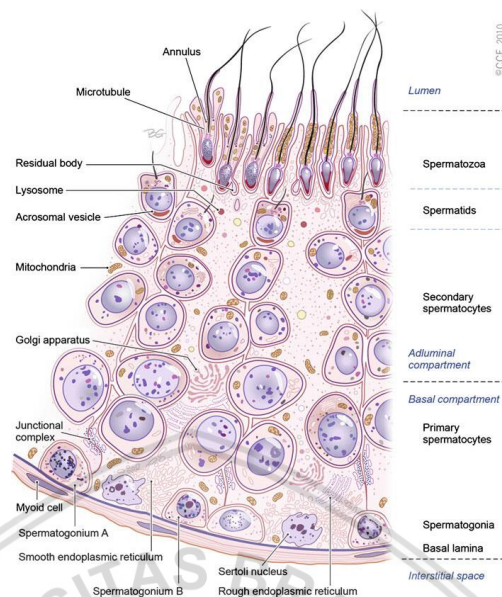
**Gambar 2.5** Struktur *Glucocorticoid Receptor  $\beta$*   
(Amanda dan Cidlowski, 2013).

### 1.6 Proses Pembentukan Spermatozoa

Proses spermatogenesis dimulai dari mekanisme hormonal di Hipotalamus yang dimulai dari sekresi *gonadotropin releasing hormone* (GnRH) oleh Hipotalamus. Sekresi *gonadotropin releasing hormone* (GnRH) memberikan respon positif (*feedback positive*) untuk menghasilkan *Luteinizing Hormone* (LH) dan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dari adenohipofisis atau hipofisis anterior dari pituitari. *Luteinizing Hormone* (LH) berfungsi untuk memberikan rangsangan terhadap pembentukan hormon steroid atau steroidogenesis di sel leydig sementara *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) berfungsi untuk memberikan rangsangan pada sel sertoli untuk proses

proliferatif dan perkembangan dari proses spermatogenesis (Zini dan Argarwal, 2014).

Proses pembentukan spermatozoa disebut juga sebagai proses spermatogenesis (**Gambar 2.6**) merupakan proses pembentukan sel gamet jantan yang terjadi di tubulus semineferus. Spermatogenesis merupakan proses pembelahan dan perkembangan spermatogonium hingga spermatozoa yang terjadi di dalam tubulus seminiferus. Proses spermatogenesis terbagi menjadi dua tahap, yaitu spermatositogenesis dan spermiogenesis. Spermatositogenesis merupakan tahap spermatogenesis dari spermatogonia menjadi spermatid, sementara spermiogenesis merupakan perubahan dari spermatid menjadi spermatozoa. Spermatogonia mengalami proliferasi secara terus menerus melalui pembelahan mitosis dan menghasilkan spermatogonia dalam jumlah besar, beberapa dari spermatogonia berhenti berproliferasi untuk mengalami diferensiasi dan membelah menjadi spermatosit primer yang mengandung kromosom diploid. Selanjutnya, sel mengalami duplikasi DNA dan pembelahan meiosis I sehingga menghasilkan spermatosit sekunder. Pembelahan meiosis menghasilkan variasi genetik, seperti pemisahan kromosom induk secara acak dan *crossover* kromosom. Lalu, spermatosit sekunder akan mengalami pembelahan meiosis II untuk menghasilkan empat sel spermatid yang mengandung kromosom haploid (Hayati, 2010).



**Gambar 2.6** Proses Pembentukan Spermatozoa  
(Zini dan Argarwal, 2014).

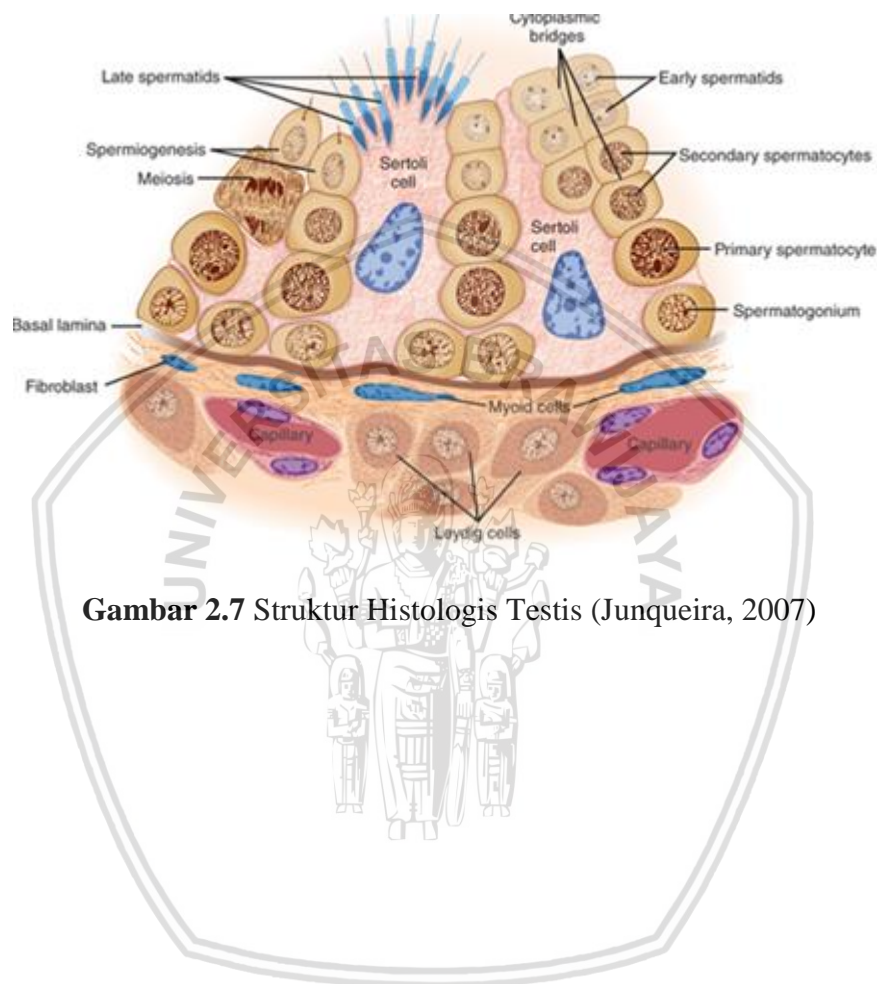
### 1.7 Anatomi dan Fisiologi Testis

Testis merupakan organ utama terpenting dalam sistem reproduksi jantan. Secara fisiologis testis memiliki fungsi reproduksi yang penting dalam hewan jantan, yaitu untuk proses spermatogenesis (eksokrin), kinerja seksual pria, dan pengaturan fungsi reproduksi secara hormonal (endokrin).

Fungsi endokrin testis adalah menghasilkan hormon-hormon reproduksi jantan sementara fungsi eksokrin adalah menghasilkan spermatozoa. Testis memiliki kompartemen luar yang dikelilingi oleh jaringan tebal berupa jaringan ikat kolagen bernama tunika albugenia. Testis memiliki tunika vaginalis yang terdiri atas lapisan parietal di luar dan lapisan visceral di bagian dalam yang membungkus tunika albugenia (Guyton dan Hall, 2007).

Secara histologis, testis terdiri atas 900 tubulus semineferus yang merupakan tempat pembentukan spermatozoa (Guyton dan Hall, 2007). Pada setiap lobus testis terdapat kompartemen sel-sel interstisial (sel leydig) yang memiliki fungsi

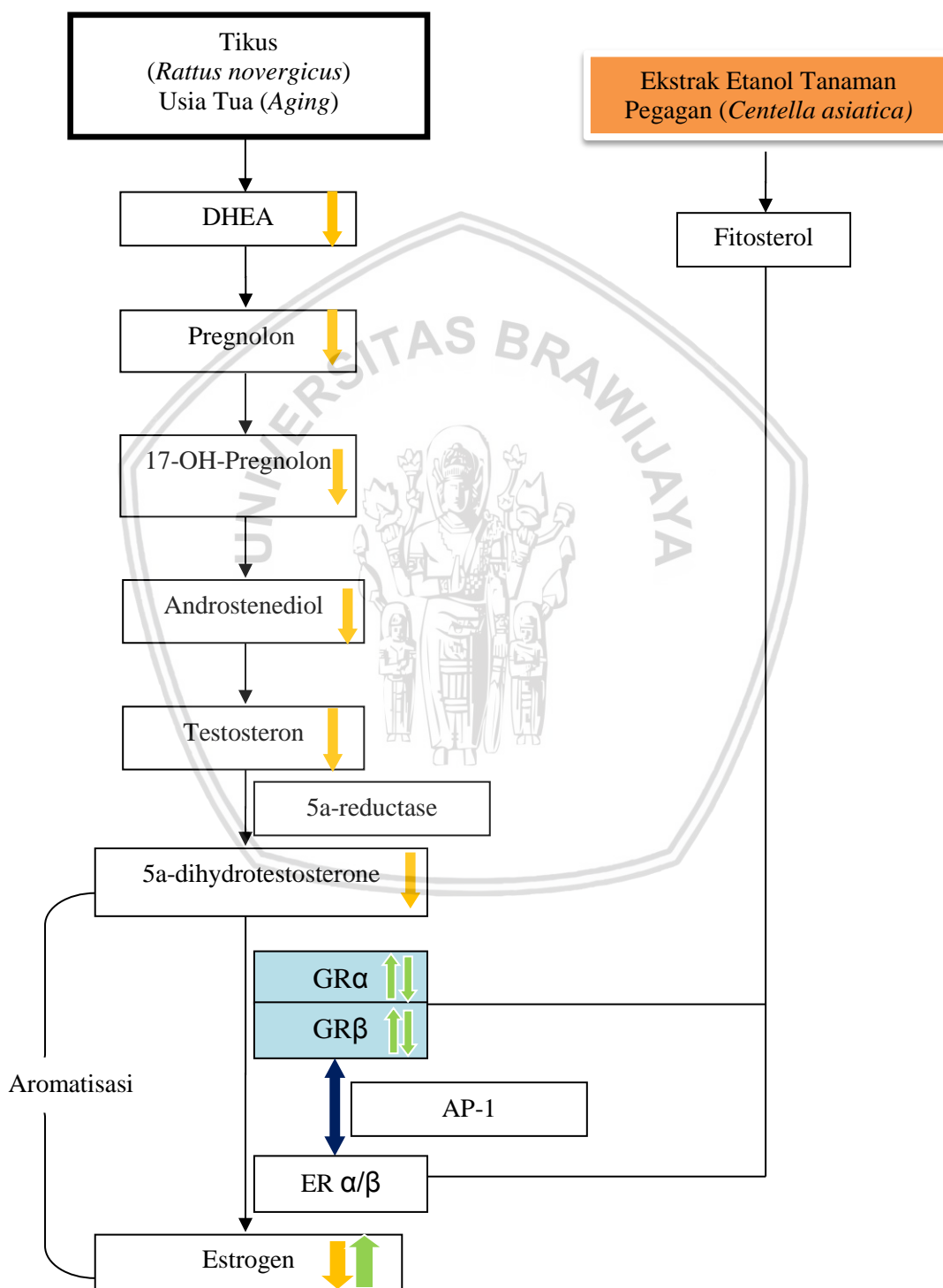
untuk menghasilkan hormon testosteron (**Gambar 2.7**). Tubulus semineferus dihubungkan oleh suatu segmen pendek dan sempit yaitu tubulus rectus dengan rete testis yaitu suatu labirin dengan saluran epitel yang tertanam di mediastinum testis.



**Gambar 2.7** Struktur Histologis Testis (Junqueira, 2007)

## BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

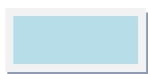
### 3.1 Kerangka Konseptual



**Gambar 3.1.** Kerangka Konsep Penelitian



Keterangan :



: Variabel bergantung



: Variabel bebas



: Kondisi tikus tua (*aging*)



: Efek pemberian *Centella asiatica*



: Diaktivasi

Proses penuaan pada hewan dapat mempengaruhi sistem reproduksi pejantan, terutama dalam memproduksi hormon-hormon yang terkait dengan reproduksi. Proses penuaan terkait hormonal disebabkan kondisi kekurangan zat *dehydroepiandrosterone* (DHEA) yang merupakan *steroid endogeneous* yang berperan sebagai prekursor dari hormon androgen dan estrogen yang dihasilkan oleh adrenal (Arlt, 2004). Penurunan *dehydroepiandrosterone* (DHEA) pada tubuh menyebabkan proses steroidogenesis menjadi berkurang. Alhasil, sebagai implikasi dari penurunan aktivitas steroidogenesis adalah menurunnya produksi estrogen yang berimbas pada menurunnya aktivitas spermatogenesis (O'donnell *et al.*, 2001). Tubuh secara periodik menghasilkan hormon untuk keperluan fisiologis tubuh termasuk dalam sistem reproduksi salah satunya hormon testosteron. Testoteron merupakan hormon yang dihasilkan oleh sel leydig yang berperan dalam spermatogenesis. Produksi testosteron diregulasi oleh aksi Hipotalamus-Pituiari-Gonadal Axis. Sekresi *gonadotropin releasing hormon* (GnRH) dari Hipotalamus merangsang Pituitari untuk mensekresikan *Luteinezing Hormone* (LH) yang bekerja langsung pada sel leydig di testis untuk



memproduksi testosteron. Produksi testosteron didapatkan dari bahan-bahan kolesterol sebagai bahan biosintesis yang berasal dari plasma darah dalam bentuk LDL yang disintesis di sel Leydig yang diawali dari penangkapan senyawa LDL oleh LDL reseptor di sel Leydig. Jalur biosintesis testosteron diawali dari perubahan pregnolon yang kemudian diubah menjadi 17-OH-pregnonon untuk diubah menjadi androstenediol dan akhirnya menjadi testosteron. Testosterone kemudian dimetabolisme oleh enzim 5 $\alpha$ -reductase untuk menjadi 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT) atau testosteron bebas untuk selanjutnya dimetabolisme menjadi estradiol oleh aromatase. Peningkatan konsentrasi dari testosteron dapat menghambat sekresi *Gonadotropin-releasing hormone* (GnRH) melalui mekanisme *feedback negative* (Lund *et al.*, 1999).

Kondisi penuaan menyebabkan terjadinya penurunan produksi testosteron (Stanworth dan Jones, 2008). Penurunan produksi testosteron berpengaruh terhadap aromatisasi testosteron menjadi estradiol. Testosteron diubah menjadi estradiol melalui mekanisme aromatisasi yang diperankan oleh enzim aromatase. Estrogen akan teraktivasi oleh reseptor estrogen yang merupakan anggota reseptor inti yang memperantarai aksi hormon estrogen didalam tubuh. Ketika estrogen berikatan dengan reseptornya, maka estrogen akan memulai untuk bekerja meregulasi pertumbuhan dan diferensiasi sel sistem reproduksi. Reseptor glucocorticoid merupakan anggota reseptor inti yang memperantarai aksi hormonal di dalam tubuh, studi menunjukkan bahwa glucocorticoid dapat mempengaruhi aktivitas reseptor estrogen melalui ikatan langsung dengan *DNA binding domain* (DBD) yang diatur oleh AP1 yang

berperan penting dalam regulasi aktivitas reseptor estrogen (Karmakar *et al.*, 2013). Peningkatan ekspresi reseptor estrogen yang disebabkan oleh aktivitas reseptor glucocorticoid yang dapat meningkat produksi estrogen.

Glucocorticoid akan bekerja melalui dua reseptor yaitu *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  (GR $\alpha$ ) dan *glucocorticoid receptor  $\beta$*  (GR $\beta$ ). *Glucocorticoid receptor  $\alpha$*  (GR $\alpha$ ) bekerja melalui aktivitas ikatan terhadap ligan, sementara *glucocorticoid receptor  $\beta$*  (GR $\beta$ ) bekerja secara antagonis dengan menghambat stimulasi *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  (GR $\alpha$ ). Daun pegagan (*Centella asiatica*) mengandung bahan aktif fitosterol yang bersifat estrogenik (Nasiroh, 2015). Pemberian bahan-bahan yang bersifat estrogenik pada penuaan diharapkan dapat meningkatkan produksi hormon estrogen melalui jalur aktivasi reseptor estrogen via *activator protein-1* (AP-1) oleh reseptor glucocorticoid ataupun aktivasi langsung reseptor estrogen secara langsung akibat bahan estrogenik tersebut. Estrogen merupakan hormon penting dalam sistem reproduksi jantan untuk menjaga fungsi-fungsi reproduksi pada terutama untuk menjaga fungsi fisiologis spermatogenesis (Zini dan Argarwal, 2014). Studi menunjukkan bahwa pemberian fitosterol yang bersifat estrogenik dapat mengaktifkan *genomic pathway* pada reseptor dengan berikatan pada *glucocorticoid receptor* yang merupakan bagian dari keluarga *intracellular nuclear hormone receptors* (Jonwoo *et al.*, 2017).

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konsep yang telah diuraikan didapatkan hipotesis penelitian sebagai berikut :

1. Pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan *glucocorticoid receptor  $\alpha$* .
2. Pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat menurunkan *glucocorticoid receptor  $\beta$* .



## BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni 2017 sampai dengan bulan Oktober 2017. Dengan penjelasan tempat penelitian sebagai berikut :

1. Proses ekstraksi tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dilakukan di Materia Medica, Batu.
2. Pemeliharaan hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
3. Pengoleksian sampel testis dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
4. Pewarnaan imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

### 4.2 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur SD usia 2 tahun yang terdiri dari 4 kelompok perlakuan. Perkiraan jumlah sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008) :

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n-5 \geq 15$$

$$4n \geq 20$$

$$n \geq 5$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan tersebut maka untuk empat kelompok hewan coba diperlukan jumlah ulangan paling sedikit lima ekor tiap kelompok sehingga diperlukan 20 ekor hewan coba pada percobaan ini.

### 4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan model rancangan acak lengkap (RAL) secara eksperimental dengan tipe *post test control design only*. Pada penelitian ini terdapat 4 kelompok hewan coba, diantaranya kelompok perlakuan 1 (P1), kelompok perlakuan 2 (P2), kelompok perlakuan 3 (P3) dan kelompok kontrol positif (KP) (**Tabel 4.1**) :

**Tabel 4.1.** Kelompok Perlakuan Pada Penelitian

Kelompok	Keterangan
Kontrol Positif	Kontrol positif merupakan tikus tua yang hanya diberikan pakan dan minum <i>ad libitum</i> selama 21 hari tanpa diberikan ekstrak tanaman pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ).
Perlakuan 1	Kelompok ini berisi tikus tua yang diberikan ekstrak tanaman pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ) dengan volume pemberian 1 mL selama 21 hari dengan dosis 100mg/kg BB.
Perlakuan 2	Kelompok ini berisi tikus tua yang diberikan ekstrak tanaman pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ) dengan volume pemberian 1 mL selama 21 hari dengan dosis 200mg/kg BB.
Perlakuan 3	Kelompok ini berisi tikus tua yang diberikan ekstrak tanaman pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ) dengan volume pemberian 1 mL selama 21 hari dengan dosis 300mg/kg BB.

### 4.4 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini terdiri dari variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel kendali. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak tanaman pegagan (*Centella asiatica*), variabel tergantung dalam penelitian ini adalah ekspresi *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  (GR $\alpha$ ) dan ekspresi *glucocorticoid receptor  $\beta$*  (GR $\beta$ ), sementara variabel kendali dalam penelitian terdiri dari

homogenitas hewan coba yang menggunakan tikus Sprague Dawley dengan jenis kelamin jantan, berat badan, dan umur yang dihomogenkan, selanjutnya homogenitas pakan yang diberikan yang mengandung protein, karbohidrat, mineral, lemak, vitamin, dan air.

## 4.5 Materi Penelitian

### 4.5.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bak pemeliharaan untuk hewan coba, box paparan, tempat makan dan minum tikus, seperangkat alat bedah, sonde, pot sampel, gelas objek, cawan petri, lemari pendingin, tabung reaksi, pipet tetes, sentrifugator, gelas ukur, *rotary evaporator*, mikrotom, *cover glass*, *vacuum drying*, maserator dan mikroskop cahaya.

### 4.5.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tanaman pegagan (*Centella asiatica*), NaCl fisiologis, aquades, etanol 70%, serbuk simplisia, letichin, ekstrak pegagan, aqua bebas CO<sub>2</sub>, PFA 4%, alkohol (70%, 80%, 90%, 95%), xylol, *phospat buffer saline* (PBS), antibodi *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  dan antibodi *glucocorticoid receptor  $\beta$* .

## 4.6 Tahapan Penelitian

### 4.6.1 Preparasi Hewan Coba

Tahap pertama pada penelitian ini adalah persiapan hewan coba yang menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain SD (*Sprague Dawley*) dengan usia 2 tahun berjenis kelamin jantan yang didapatkan dari hasil perkembangbiakan yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran UB dengan berat

badan awal berkisar 300 gram. Ukuran kandang yang digunakan berukuran 17,5 x 23,75 x 17,5 cm. Pengaturan suhu ruangan yaitu 22-24°C dengan kelembapan udara 60%-70% serta pemberian ransum diberikan sebanyak 20 g per ekor per hari dengan pemberian air minum secara *ad libitum*. Berat badan tiap tikus dan pembersihan kandang dilakukan setiap 3 hari.

#### **4.6.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*)**

Pada tahap ini dilakukan proses pembuatan phytosome ekstrak tanaman pegagan (*Centella asiatica*). Proses pembuatan dimulai dengan menambahkan 400 mg serbuk simplisia dengan 500 mL etanol 70%, dan dicampur dalam maserator dengan diaduk secara perlahan selama 30 menit. Hasil campuran disimpan selama 24 jam dan dilakukan proses remaserasi. Filtrat disaring dan diuapkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu sebesar 30°C dan di *vacuum drying* untuk menghilangkan kadar air.

Ekstrak tanaman pegagan kemudian dibuat bentuk *phytosome* dengan metode sonikasi (mencampur letichin, etanol 70%, ekstrak tanaman pegagan) lalu distirer  $\pm$  3 jam dengan *magnetic stirrer* 2000rpm dan dilakukan penguapan pelarut dengan *rotary evaporator* kemudian dihidrasi dengan aqua bebas CO<sub>2</sub>.

#### **4.6.3 Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) pada Hewan Coba**

Ekstrak etanol tanaman pegagan diberikan pada hewan coba dengan dosis bertingkat yaitu 100 mg/kg BB, 200 mg/kg BB, dan 300 mg/kg BB. Pemberian dilakukan secara per oral menggunakan sonde lambung selama 21



hari. Setiap tikus putih (*Rattus norvegicus*) disonde dengan ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebanyak 1 mL.

#### 4.6.4 Pengambilan Sampel Organ Testis

Pengambilan organ testis dilakukan pada hari ke 22 setelah pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) pada semua perlakuan yaitu kelompok kontrol positif, perlakuan 1 (100 mg/kg BB), perlakuan 2 (200 mg/kg BB), dan perlakuan 3 (300 mg/kg BB). Pengambilan organ dilakukan pada hari ke 22 dengan dilakukan metode *euthanasia* melalui metode dislokasi leher, lalu tikus direbahkan dengan posisi rebah dorsal untuk dilakukan pembedahan pada otot sepanjang abdomen sampai daerah kepala, lalu organ testis diambil dari scrotum di daerah prepubis dilanjutkan dengan memotong testis kemudian diisolasi.

#### 4.6.5 Analisis *Glucocorticoid Receptor $\alpha$* dan *Glucocorticoid Receptor $\beta$* pada dengan Metode Immunohistokimia

Immunohistokimia merupakan metode untuk mendeteksi molekul yang ada di dalam jaringan dengan menggunakan metode poliklonal atau monoklonal terhadap antibodi yang dideteksi dengan menggunakan reaksi antara antigen dan antibodi (Balqis *et al.*, 2011). Prosedur pewarnaan immunohistokimia dimulai dari deparafinasi yang merupakan proses menghilangkan parafin yang terdapat di dalam jaringan, yang bertujuan untuk mempermudah proses masuknya zat warna ke dalam jaringan. Deparafinasi dilakukan dengan memasukkan preparat ke dalam xylol bertingkat I sampai III masing-masing selama lima menit. Berikutnya, proses rehidrasi dengan menggunakan alkohol bertingkat dengan (95%, 90%, 85%, 80%, 70%) selama

10-15 menit. Proses dilanjutkan dengan menghilangkan peroksidasi endogen dengan menggunakan substrat metanol dan selanjutnya dilakukan proses pencucian dengan menggunakan PBS sebanyak 100 µl selama 5-10 menit. Proses selanjutnya adalah pengeringan pada bagian permukaan jaringan dengan menggunakan kertas tisu. Sediaan selanjutnya disejajarkan secara mendatar dalam kotak untuk kemudian ditutup rapat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30-60 menit. Proses selanjutnya yaitu pencucian dengan PBS sebanyak 100 µl dan dilanjutkan dengan pemberian antibodi primer dan diinkubasi dalam lemari pendingin suhu 4°C selama 1 malam. Setelah proses penyimpanan selama semalam dilakukan proses pencucian dengan PBS sebanyak 100 µl selama tiga kali untuk selanjutnya diberikan antibodi sekunder *glucocorticoid receptor α* dan *glucocorticoid receptor β* sebanyak 80 µl per preparat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30-60 menit. Selanjutnya yaitu proses penambahan DAB (3,3-*diaminobenzidine*) sebanyak 10 mg dalam *tris buffer* (50 cc) yang dicampur dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 µl). DAB (3,3-*diaminobenzidine*) merupakan agen yang dapat memberikan warna pada pewarnaan immunohistokimia yang terdeteksi dengan warna cokelat (Balqis *et al.*, 2011). Selanjutnya, preparat di tambahkan PBS 100 µl dan dilanjutkan dengan proses *counterstain* dengan menggunakan hematoxylin dan tahap terakhir adalah pengeringan preparat.

#### 4.6.6 Analisis Data

Analisis data yang digunakan yaitu menggunakan analisa kuantitatif.

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekspresi *glucocorticoid*

*receptor  $\alpha$*  dan ekspresi *glucocorticoid receptor  $\beta$*  yang dianalisis secara kuantitatif menggunakan *one way Analysis of Variance* (ANOVA) dengan *software IBM SPSS Statistic 16.0*.



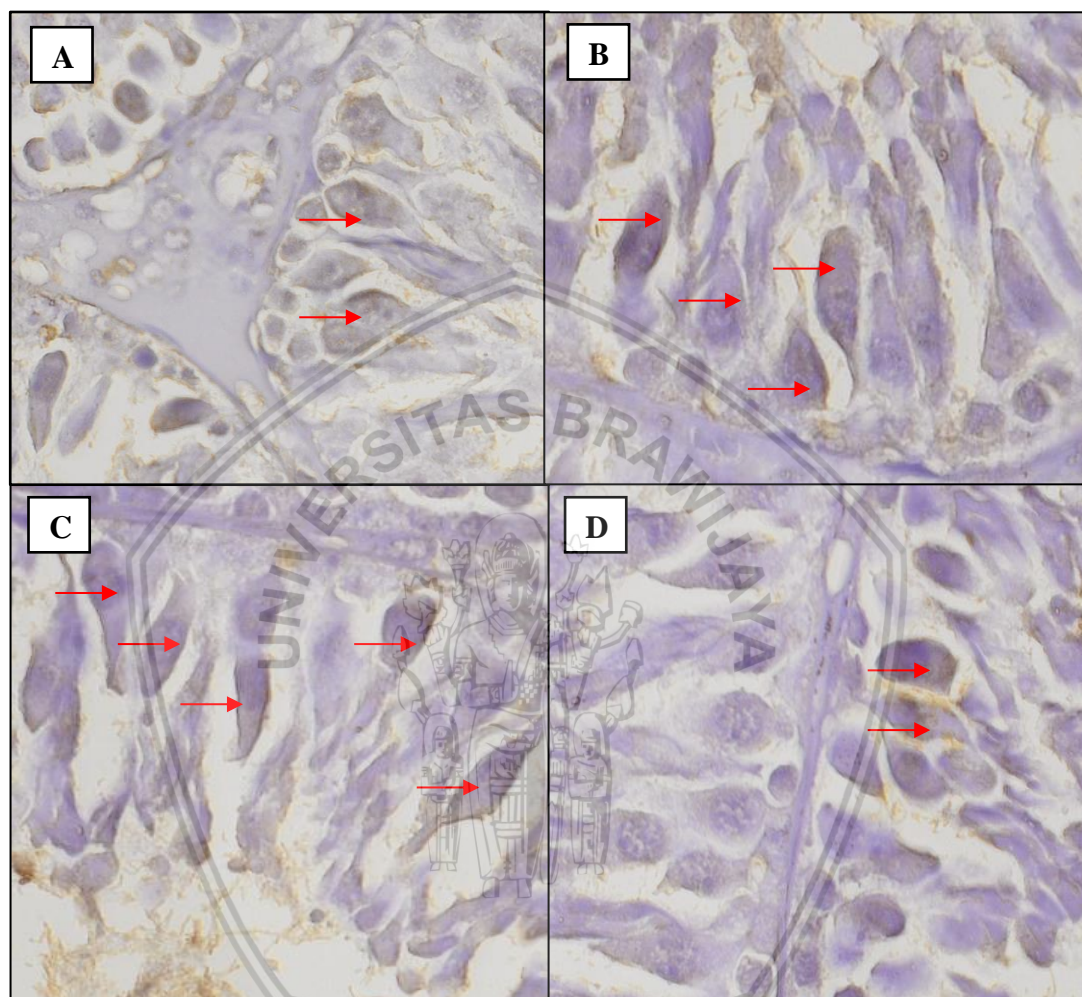
## BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Ekspresi *Glucocorticoid Receptor $\alpha$*

Potensi ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) terhadap ekspresi *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  dapat diamati pada sel sertoli dengan metode immunohistokimia. Tikus jantan usia tua yang digunakan dibagi menjadi 4 kelompok dengan jumlah hewan coba sebanyak 20 ekor tikus. Tikus dibagi menjadi kelompok kontrol positif (KP), kelompok perlakuan 1 dengan dosis 100 mg/KgBB (KP1), kelompok perlakuan 2 dengan dosis 200 mg/KgBB (KP2), dan kelompok perlakuan 3 dengan dosis 300 mg/KgBB (KP3) yang diberikan terapi ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) selama 21 hari. Pada hari ke 22 tikus dibedah dan dilakukan isolasi organ testis untuk diamati secara immunohistokimia.

Hasil penelitian menunjukkan pada kelompok tikus kontrol positif yang tidak diberikan perlakuan ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) menunjukkan hasil dengan ditandai adanya ekspresi *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  dengan ciri warna cokelat pada sel sertoli (**Gambar 5.1a**). Tikus kelompok perlakuan 1 dengan dosis perlakuan ekstrak etanol 100 mg/KgBB menunjukkan hasil ekspresi *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  lebih tinggi dari kelompok kontrol positif (**Gambar 5.1b**), sementara pada tikus perlakuan 2 dengan dosis perlakuan ekstrak etanol 200 mg/KgBB menunjukkan hasil dengan ekspresi *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  yang meningkat dari kelompok kontrol positif dan kelompok tikus perlakuan 1 (**Gambar 5.1c**), namun pada tikus perlakuan 3 dengan dosis 300 mg/KgBB

terjadi penurunan ekspresi dari kelompok tikus perlakuan 1 dan tikus perlakuan 2 (Gambar 5.1d).



**Gambar 5.1** Hasil Imunohistokimia Jaringan Testis Terhadap Ekspresi *Glucocorticoid Receptor  $\alpha$*

A = Kontrol positif (tikus tua)

B = Perlakuan 1 (pemberian ekstrak etanol pegagan 100mg/kgBB)

C = Perlakuan 2 (pemberian ekstrak etanol pegagan 200mg/kgBB)

D = Perlakuan 3 (pemberian ekstrak etanol pegagan 300mg/kgBB)

Keterangan Gambar :

→ : Ekspresi *glucocorticoid receptor  $\alpha$*



**Tabel 5.1** Ekspresi *Glucocorticoid Receptor  $\alpha$*  Jaringan Tikus Tua Pasca Terapi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan

Kelompok	Rata-rata Ekspresi GR $\alpha$ $\pm$ SD (sel)
Kontrol Positif (KP)	28,00 $\pm$ 9,13 <sup>a</sup>
Dosis 1 (100 mg/kg BB)	43,4 $\pm$ 13,8 <sup>ab</sup>
Dosis 2 (200 mg/kg BB)	57,4 $\pm$ 23,35 <sup>b</sup>
Dosis 3 (300 mg/kg BB)	38,2 $\pm$ 9,65 <sup>a</sup>

Keterangan: Notasi a dan b menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) antara satu perlakuan dengan perlakuan lainnya.

Hasil akumulasi ekspresi *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  yang dianalisa secara *One Way ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) diantara perlakuan (**Lampiran 7**). Hasil uji Tukey menunjukkan bahwa kelompok perlakuan ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) memiliki perbedaan yang nyata dengan kelompok kontrol positif yang ditandai dengan perbedaan notasi (**Tabel 5.1**). Dari hasil penelitian didapatkan kelompok kontrol positif (KP) menunjukkan rata-rata ekspresi *glucocorticoid* terendah dibandingkan dengan kelompok perlakuan. Kelompok tikus kontrol positif memiliki rata-rata ekspresi *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  sebanyak  $28,00 \pm 9,13\%$ . Kelompok tikus kontrol positif (KP) ini digunakan sebagai indikator ekspresi *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  pada tikus usia tua secara fisiologis dan pembanding dengan ekspresi *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  pada kelompok tikus perlakuan. Hal ini terjadi karena dalam hewan tua ekspresi *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  secara normal akan terbentuk, pada hewan tua ekspresi *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  terkait dengan hormonal yang secara fisiologis dihasilkan oleh kelenjar adrenal. Glucocorticoid yang

disekresikan oleh tubuh berasal dari *adrenalcorticotropin hormone* (ACTH) yang dilepaskan untuk tubuh secara periodik. *Glucocorticoid receptor  $\alpha$*  merupakan reseptor tubuh golongan *steroid receptor* yang akan terekspresi apabila terdapat molekul glucocorticoid yang berikatan melalui *glucocorticoid response elements* (GERs) (Amanda dan Cidlowski, 2013).

Hasil pada kelompok perlakuan dengan dosis 100 mg/KgBB (KP1), 200 mg/KgBB dan 300 mg/KgBB (KP3) mengalami peningkatan. Peningkatan tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan ekspresi *glucocorticoid receptor  $\alpha$* . Kelompok dosis 100 mg/KgBB (KP1) memiliki rata-rata ekspresi *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  sebanyak  $43,4 \pm 13,8\%$ , sementara pada kelompok dosis 200 mg/KgBB memiliki rata-rata ekspresi *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  sebanyak  $57,4 \pm 23,35\%$  dan pada dosis 300 mg/KgBB memiliki rata-rata ekspresi sebanyak  $38,2 \pm 9,65\%$  (**Tabel 5.1**).

Kelompok dosis 200 mg/KgBB (KP2) terjadi peningkatan yang signifikan dibandingkan kelompok lainnya. Peningkatan ekspresi tersebut terkait dengan sifat ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) yang merupakan agen profertilitas. Pemberian perlakuan dengan ekstrak tersebut dapat meningkatkan aktivitas steroidogenesis dari testosteron yang diikuti dengan peningkatan aktivitas reseptor golongan steroid. Hal ini sesuai menurut Winarto (2003) yang menyebutkan bahwa ekstrak tanaman pegagan mengandung senyawa seperti fitosterol yang memiliki struktur yang mirip dengan kolesterol sebagai bahan untuk proses steroidogenesis. Ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella*



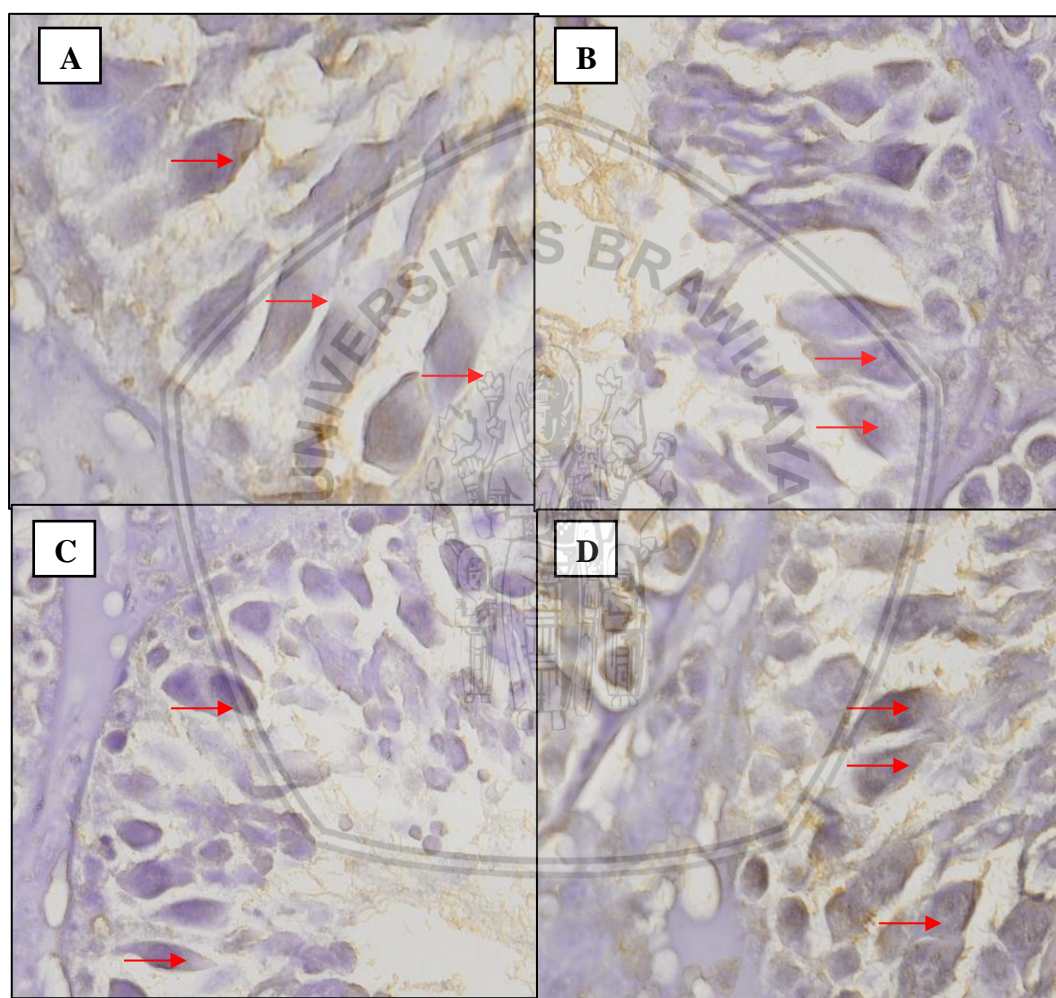
*asiatica*) yang mengandung fitosterol memiliki struktur kerangka dengan cincin siklopentana perhidrofenantrena yang menyerupai kolesterol. Peningkatan kadar steroid dapat disebabkan oleh senyawa triterpenoid dari ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) yang memiliki keserupaan adanya ikatan biogenesis dengan kolesterol (Jonwoo *et al.*, 2017).

Kelompok dosis 300 mg/KgBB menunjukkan hasil penurunan ekspresi *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  dibandingkan dengan kelompok dosis 100 mg/KgBB dan kelompok dosis 200 mg/KgBB. Penurunan ekspresi tersebut lebih disebabkan oleh pemberian bahan aktif fitosterol dari tanaman pegagan (*Centella asiatica*) yang bersifat estrogenik mengaktifkan langsung jalur reseptor estrogen melalui *estrogen response elements* (ERE). Mekanisme aktivasi reseptor estrogen akibat pemberian bahan yang bersifat estrogenik disebabkan oleh ikatan antara ligan dengan daerah *ligand binding domain* (LBD) dari reseptor estrogen. Fungsi aktivasi dari reseptor estrogen diperan oleh bagian transaktivasi utama (AF-1) yang terdapat dalam terminal asam amino A dan B yang berfungsi sebagai aktivator yang independen terhadap ligan. Proses pengikatan bahan aktif fitosterol terjadi di membran sel, dan berikatan dalam bentuk dimer. Setelah terjadi ikatan dengan reseptor, reseptor akan berpindah ke inti sel dan berikatan dengan *estrogen response element* (ERE) dan kompleks tersebut berikatan dengan koaktivator sehingga faktor transkripsi menjadi aktif yang mengubah ekspresi gen (Mulyati, 2016).

Potensi ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan aktivitas reproduksi jantan sehingga dapat dijadikan sebagai bahan

profertilitas alami untuk reproduksi jantan. Peningkatan reseptor glucocorticoid dapat menunjukkan meningkatnya aktivitas hormonal steroidogenesis pada hewan jantan.

## 5.2 Pengaruh Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Ekspresi *Glucocorticoid Receptor $\beta$*



**Gambar 5.2.** Hasil Imunohistokimia Jaringan Testis Terhadap Ekspresi *Glucocorticoid Receptor  $\beta$*

A = Kontrol positif (tikus tua)

B = Perlakuan 1 (pemberian ekstrak etanol pegagan 100mg/kgBB)

C = Perlakuan 2 (pemberian ekstrak etanol pegagan 200mg/kgBB)

D = Perlakuan 3 (pemberian ekstrak etanol pegagan 300mg/kgBB)

Keterangan Gambar :

→ : Ekspresi *glucocorticoid receptor  $\beta$*

*Glucocorticoid receptor  $\beta$*  memiliki fungsi yang berbeda dengan *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  pada sistem reproduksi jantan. Sistem kerja antara *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  dan *glucocorticoid receptor  $\beta$*  adalah antagonis. Sifat antagonis dapat terjadi karena kerja kedua reseptor yang secara kompetitif mengikat *glucocorticoid response element* (GREs) (Amanda dan Cidlowski, 2013).

Ekspresi *glucocorticoid receptor  $\beta$*  banyak terekspresi pada sel sertoli testis (Hazra *et al.*, 2013). Berdasarkan pengamatan mikroskopis didapatkan kelompok kontrol positif menunjukkan hasil dengan rata-rata yang tinggi dibandingkan dengan kelompok lain (**Gambar 5.2a**). Sementara itu pada kelompok dosis perlakuan, yaitu kelompok dosis 100 mg/KgBB (KP1), kelompok dosis 200 mg/KgBB (KP2), dan kelompok dosis 300 mg/KgBB (KP3) mengalami penurunan ekspresi *glucocorticoid receptor  $\beta$* . Hal ini menunjukkan bahwa pengaruh pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat mempengaruhi ekspresi *glucocorticoid receptor  $\beta$* .

Kelompok perlakuan dosis 100 mg/KgBB (KP1) memiliki ekspresi *glucocorticoid receptor  $\beta$*  yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol positif ditandai dengan warna reseptor yang berwarna coklat pada sel sertoli (**Gambar 5.2b**), sementara itu pada kelompok perlakuan dosis 300 mg (KP3) juga mengalami penurunan ekspresi *glucocorticoid receptor  $\beta$*  dibandingkan dengan kontrol positif setelah perlakuan terapi (**Gambar 5.2d**), namun penurunan ekspresi *glucocorticoid receptor  $\beta$*  teramati pada kelompok

dosis perlakuan 200 mg/KgBB (KP2) dengan ditandai warna cokelat pada reseptor di sel sertoli yang jarang (**Gambar 5.2c**)

Tabel 5.2 Ekspresi *Glucocorticoid Receptor  $\beta$*  Ekspresi *Glucocorticoid Receptor  $\beta$*  Jaringan Tikus Tua Pasca Terapi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan

Kelompok	Rata-rata Ekspresi GR $\beta$ $\pm$ SD (sel)
Kontrol Positif (KP)	22,6 $\pm$ 4,5 <sup>b</sup>
Dosis 1 (100 mg/kg BB)	14,2 $\pm$ 3,56 <sup>a</sup>
Dosis 2 (200 mg/kg BB)	10,8 $\pm$ 0,83 <sup>a</sup>
Dosis 3 (300 mg/kg BB)	13,8 $\pm$ 4,81 <sup>a</sup>

Keterangan: Notasi a dan b menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) antara satu perlakuan dengan perlakuan lainnya

Hasil akumulasi ekspresi *glucocorticoid receptor  $\beta$*  dianalisa secara *One Way ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol positif (**Lampiran 5**). Hasil uji Tukey menunjukkan bahwa kelompok perlakuan ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) memiliki perbedaan yang nyata dengan kelompok kontrol positif yang ditandai dengan perbedaan notasi (**Tabel 5.2**). Data menunjukkan rata-rata ekspresi *glucocorticoid receptor  $\beta$*  yang signifikan dari kelompok kontrol positif dan kelompok dosis 100 mg/KgBB (KP1), 200 mg/KgBB (KP2), dan 300 mg/KgBB (KP3). Kelompok kontrol positif (KP) menunjukkan rata-rata sebesar 22,6  $\pm$  4,5%, hal ini menunjukkan bahwa pada tikus tua memiliki ekspresi *glucocorticoid receptor  $\beta$*  yang tinggi dibandingkan kelompok lain yang diberikan perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*).



Kelompok perlakuan 1 (100mg/KgBB) menunjukkan ekspresi penurunan *glucocorticoid receptor  $\beta$*  dengan nilai ( $14,2 \pm 3,56$ ). Hasil pada kelompok perlakuan 2 (200 mg/KgBB) menunjukkan penurunan ekspresi *glucocorticoid receptor  $\beta$*  yang rendah dari kontrol positif, hasil pada kelompok perlakuan 2 menunjukkan hasil rata-rata sebesar  $10,8 \pm 0,83$  yang merupakan rata-rata ekspresi terendah dari *glucocorticoid receptor  $\beta$* . Pada kelompok perlakuan 3 (300 mg/KgBB) juga menunjukkan penurunan ekspresi *glucocorticoid receptor  $\beta$*  dengan rata-rata  $38,2 \pm 9,65$  yang menunjukkan bahwa semua kelompok perlakuan dapat menurunkan ekspresi *glucocorticoid receptor  $\beta$* .

Kelompok perlakuan 2 (200 mg/KgBB) menunjukkan penurunan ekspresi *glucocorticoid receptor  $\beta$*  yang paling rendah, hal ini dapat dijadikan kandidat sebagai pilihan dosis yang baik dari ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*). Penurunan ekspresi *glucocorticoid receptor  $\beta$*  terjadi karena aktivitas ikatan ligan dengan *glucocorticoid response element* yang rendah, namun aktivitas ikatan ligan dengan reseptor justru tinggi pada *glucocorticoid receptor  $\alpha$* . Apabila terjadi penurunan ekspresi dari *glucocorticoid receptor  $\beta$*  menunjukkan penurunan sensitivitas terhadap glucocorticoid pada suatu jaringan (Leung dan Bloom, 2009). Penurunan sensitivitas *glucocorticoid receptor  $\beta$*  setelah pemberian dosis 200 mg/KgBB membuktikan bahwa dosis 200 mg/KgBB memberikan efek terapi untuk meningkatkan aktivitas glucocorticoid di dalam tubuh, yang dapat membantu proses steroidogenesis pada hewan jantan.

Pada kelompok perlakuan 3 (300 mg/KgBB) didapatkan bahwa hasil meningkat dari perlakuan 1 (100 mg/KgBB) dan perlakuan 2 (200 mg/KgBB)

namun rata-rata ekspresi *glucocorticoid receptor  $\beta$*  masih rendah dari kelompok kontrol positif.

Perbandingan ekspresi *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  dan ekspresi *glucocorticoid receptor  $\beta$*  dapat menunjukkan kondisi fisiologis reproduksi pada hewan jantan yang mengalami penuaan. Hasil penelitian yang menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) menyebabkan peningkatan ekspresi *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  dan penurunan ekspresi *glucocorticoid receptor  $\beta$*  menggambarkan bahwa bahan aktif fitosterol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) terbukti mampu mempengaruhi aktivitas glucocorticoid di dalam tubuh. Sifat kerja kedua reseptor yang kompetitif ini dapat menunjukkan aktivitas biosintesis dari steroidogenesis pada hewan tua. Pada hewan tua adanya ekspresi *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  yang tinggi dan penurunan *glucocorticoid receptor  $\beta$*  sangat diperlukan untuk meningkatkan peran glucocorticoid terhadap proses steroidogenesis terutama dalam pembentukan hormon estrogen melalui aktivitas aromatisasi.

*Glucocorticoid receptor* dapat mempengaruhi kerja dari *estrogen receptor* melalui aktivasi protein AP-1, melalui jalur aktivasi tersebut ekspresi *estrogen receptor* akan dapat ditingkatkan dalam memproduksi estrogen (Karmakar, 2013). Menurut Rosalie (1997) disebutkan bahwa reseptor golongan steroid akan dapat saling mempengaruhi kerja reseptor steroid lain termasuk *estrogen receptor*. Menurut Vahrenkamp (2017) ikatan glucocorticoid akan dapat meningkatkan estradiol dalam tahap transkripsi yang mana lokus dari *estrogen*

*response element* akan mudah berikatan dengan estrogen apabila terdapat molekul glucocorticoid.





## BAB VI PENUTUP

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan didapatkan hasil kesimpulan sebagai berikut :

1. Pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan ekspresi *glucocorticoid receptor  $\alpha$*  pada sel sertoli tikus (*Rattus norvegicus*) usia tua dengan dosis pemberian terbaik sebesar 200 mg/kg BB.
2. Pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat menurunkan ekspresi *glucocorticoid receptor  $\beta$*  pada sel sertoli tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua.

### 6.2 Saran

1. Penggunaan ekstrak tanaman pegagan (*Centella asiatica*) baik digunakan untuk meningkatkan aktivitas spermatogenesis hewan jantan yang digunakan sebagai pembibitan untuk inseminasi buatan dikarenakan evaluasi terhadap kualitas spermatozoa dapat diamati secara mikroskopis.

## DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, B. 2010. *Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi Sebagai Anti Fertilitas*. Jakarta : Adabia Press. 4-5
- Akil HA & Morano MI. 1995. *Stress in Bloom FE and Kupfer DJ. Psychopharmacology*. New York: Raven Press. 773-779.
- Amanda, L dan Cidlowski, J. 2013. Tissue Spesific Action of Glucocorticoid on Apoptosis : *A Double Edge Sword Cells* (2) : 202-203
- Arlt, Weibke. 2004. *Dehydroepiandrosterone and Ageing. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* Vol. 18, No. 3
- Berata, I.K., Arjana, Sudira, W., Merdana, W., Budiasa, K., Oka, I., 2010. Studi Patologis Kejadian Cysticercosis Pada Tikus Putih. *Jurnal Veteriner* : 11(4): 232-237
- Balqis, U., Darmawi., Handariyani., dan M., Hambali. 2011. Deteksi Keberadaan Antigen Pada Kutikula *Ascaridia galli* dengan Immunoglobulin Yolk Melalui Metode Immunohistokimia. Unsyiah : Banda Aceh
- Cunningham, I., Knox, P.C., Rowe, F. 2003. Modified Attentional Fields in Ageing. *Ophthalmic and Physiological Optics Journal* (22) : 580-586
- Dalimartha, S. 2000. Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid 2. Trubus Agriwidya, Jakarta. 214 hlm.214
- Duke, S. 2012. Hipotalamus Pituitary Axis (HPA Axis) diakses melalui <https://sites.duke.edu/traumaindiaspora/132-2/> (18 Januari 2018)
- Goldman, B dan Kaltz, R. 2007. Anti Aging Therapuetics Vol VI. American Academy of Anti Aging Medicine
- Guyton A.C. and J.E. Hall 2007. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi 9. Jakarta: EGC
- Haarman, E.G., Kaspers, GJL., Pieters, R., Rottier, MMA., Veerman, AJP. 2004. Glucocorticoid Receptor Alpha, Beta, dan Gamma Expression vs In Vitro Glucocorticoid Resistance in Childhoold Leukemia. Nature Publishing Group (18) : 530-537.
- Hayati, A. 2010. *Spermatologi*. Surabaya : Airlangga University Press.

- Hazra,R., Upton,D.,Jimenez,M., Desai,R., Handelsman, J., dan Allan,C. 2013. In Vivo Actions of the Sertoli Cell Glucocorticoid Receptor. *Endo Journal* (3) : halaman 1120-1130.
- Junqueira, LC., 2007. *Histology Dasar*: Teks dan Atlas. Edisi 10. Jakarta
- Karmakar,S.Jin, Y dan Akhilesh K. Nagaich. 2013. Interaction of Glucocorticoid Receptor (GR) with Estrogen Receptor (ER) and Activator Protein 1 (AP1) in Dexamethasone-mediated Interference of ER Activity. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* (33). Halaman 24020 – 24034.
- Kheirabad, K,M., B. N. Jahromi , F. Rahmanifar., A. Tamadon., M. Owjfar., N. Tanideh., Koochi-hosseiniabadi. 2016. Effects of Antiglucocorticoid Pretreatment on Testes In Chronically Stressed Adult Rats-A Histomorphometric Study. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* (4) : 281-289
- Kinyamu,,H.,K and Archer,.T .2003. Estrogen Receptor-Dependent Proteasomal Degradation of the Glucocorticoid Receptor Is Coupled to an Increase in Mdm2 Protein Expression. *Molecular and Cell Biology* (23) : 5867-5881
- Kormin, S. 2005. The effect of Heat Processing on Triterpene Glycosides and Antioxidant Activity of Herbal Pegagan (*Centella asiatica*) Drink [Thesis]. Kuala Lumpur : Universiti Teknologi Malaysia.
- Kusriningrum, 2008. *Perancangan Percobaan*. Airlangga University Press. Surabaya. 3-15.
- Leung , D & Bloom , J. 2009. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol* 111(1): 3-22.
- Luna, H., Budik, S., Aurich, C. Gene. 2012. Expression of ACTH, Glucocorticoid Receptors, 11bHSD Enzymes, LH-, FSH-, GH Receptors and Aromatase in Equine Epididymal and Testicular Tissue. *Reproduction in Domestic Animal*
- Maula, F.I. 2014. Uji Antifertilitas Ekstrak N-Heksana Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas L.*) Pada Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*) Galur Sprague Dawley Secara In Vivo [Skripsi]. Jakarta : UIN Syarif Hidayatullah
- Myres, P. dan Armitage, D. 2004. “*Rattus norvegicus*” Animal Diversity.[http://www.animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rattus\\_novergicus.htm](http://www.animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rattus_novergicus.htm) [Diakses tanggal 16 Januari 2018].

- Mulyati, B. 2016. Studi Komputasi Interaksi Isoflavon dengan Reseptor Estrogen  $\beta$  Menggunakan Oniom. *EduChemia* (1) : 137-148
- Nasiroh, S.I. 2015. *Pengaruh Kombinasi Ekstrak Daun Pegagan (Centella asiatica L Urban) dan Daun Beluntas (Pluchea indica L) Terhadap Kadar Hormon Estrogen dan Berat Uterus Tikus Putih (Rattus norvegicus Betina* [Skripsi]. Malang : UIN Maulana Malik Ibrahim
- Odawara, H. , Iwasaki, T., Horiguchi, J., Rokutanda, N., Hirooka, K., Miyazaki, W., Yukio Koibuchi, Y., Shimokawa, N., Yuichi Iino, Takeyoshi, I., dan Koibuchi, N. 2009. Activation of Aromatase Expression by Retinoic Acid Receptor-related Orphan Receptor (ROR) in Breast Cancer Cells. *The Journal of Biology Chemistry* (26) : halaman 17711–17719
- O'donnell, L. Kristen, M. Margarette, E. Simpson, E. 2001. Estrogen and Spermatogenesis. *Endocrine Reviews* 22(3): 289–318
- Okon, A., Adjoa, N., Patricia, D., 2017. Biopsy and Vascularization: Testicular Tissue Removal and Prevention of Hemorrhages Related To The Main Vessels. *Journal Histology and Histopathology Herbert* (2) : 2-5
- Pangkahila, W. 2007. *Memperlambat Penuaan, Meningkatkan Kualitas Hidup Anti Aging Medicine*. Cetakan ke-1. Jakarta : Penerbit Buku Kompas. Hal. 133-144.
- Pinto, A. , Malacrida, B., Oieni, J., Melania, M., Galbiati, V., Corsini, E., dan Marco, R. 2015. DHEA Modulates The Effect Of Cortisol On Rack1 Expression Via Interference With The Splicing of The Glucocorticoid Receptor. *British Journal of Pharmacology*: 2918–2927
- Joonwoo, P. , Heewon S. , Si-Kwan Kim., Myeong Soo Lee . Dong-Kwon Rhee , YoungJoo L. 2017. Effects of Ginseng On Two Main Sex Steroid Hormone Receptors: Estrogen and Androgen Receptor. *J Ginseng Res* (41) : halaman 215-221.
- J.M. Vahrenkamp, Chieh-Hsiang Yang, Adriana C. Rodriguez, Aliyah Almomen Kristofer Berrett, Alexis N. Trujillo, Katrin P. Guillen, Bryan E. Welm, Elke A. Jarboe Margit M. JanatAmsbury dan Jason Gertz. 2017. Clinical And Genomic Crosstalk Between Glucocorticoid Receptor And Estrogen Receptor A In Endometrial Cancer. *Biorvix* : 1-13
- Riyadhi, M., Arifiantini, R., Purwantara, B. 2012. Korelasi Morfologi Abnormalitas Primer Spermatozoa Terhadap Umur Pada Beberapa Bangsa Sapi Potong. *Agroscientia* 19 : 75-85.

- Rosalie M. Uht, Carol M. Anderson, Paul Webb, dan Peter J. Kushner. 1997. Transcriptional Activities of Estrogen and Glucocorticoid Receptors Are Functionally Integrated at the AP-1 Response Element. *Endocrinology Society* (7) page 2900-2909
- Schluster, M., Aaron, M.B., Ramasamy.R. 2016. The Role Estradiol in Male Reproductive Function. *Asian Journal of Andrology* (18) : halaman 435-440.
- Sengupta, P. 2013. The laboratory rat: Relating its age with human's. *International Journal of Preventive Medicine* 4(6): 624–630
- Spiga, F., Zavalab, E., Jamie J. Walkera., Zidong, Z., John R. Terry dan Stafford L. Lightmana. 2017. Dynamic Responses of The Adrenal Steroidogenic Regulatory Network. *PNAS* : 134-158
- Smith dan Mangkoewidjojo. 1998. Pemeliharaan, Pembiakan, dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis Edisi 1. Jakarta : UI Press : 37-39
- Soejono, C. H. 2004. Pasien Geriatri dan Permasalahannya. *Artikel Medika* (5)
- Sutardi. 2016. Kandungan Bahan Aktif Tanaman Pegagan dan Khasiatnya Untuk Meningkatkan Sistem Imun Tubuh. *Jurnal Litbang Pertanian* : 35 (3) : 122-130
- Sugianto, I. S., Subandi, dan Muntholib. 2013. Fitokimia Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) dan Buah Sirsak (*Annona murcata L.*) Serta Potensinya Sebagai Inhibitor Enzim Xantin Oksidase. *Jurnal Ilmiah Universitas Negeri Malang* (2) : 87-92.
- Wang,J,Z., Jeffs, B., Ito, M., Achermann, J., Richard, N., Hales, D., dan Jameson, L. 2001. Aromatase (Cyp19) expression is up-regulated by targeted disruption of Dax1 . *PNAS* (14) : halaman 7988–7993
- Winarto, W. R. dan Surbakti, M. 2003. *Khasiat dan Manfaat Pegagan*. Jakarta : Agromedia Pustaka.
- Zini, A dan Agarwal, A. 2014. *Spermatogenesis : An Overview*. Research Gate : halaman 1-27